# 棉卷叶野螟泛素基因的克隆、序列分析及原核表达

张宇宏[1]，林　同[1,2,*]，张　琪[1]，常润磊[1]，温秀军[1]

（1. 华南农业大学林学院，广州　510642；2. 华南农业大学经济林研究中心，广州　510642）

**摘要**：本研究用 RT-PCR 方法，克隆了棉卷叶野螟 *Haritalodes derogata*（Fabricius）泛素基因编码区，GenBank 登录号为 EU580145。序列分析表明，该编码区长 228 bp，编码 76 个氨基酸，推测的编码蛋白的相对分子质量和等电点分别为 8.53 kD 和 5.83。同源性比较发现，棉卷叶野螟泛素基因与其他 10 种昆虫泛素基因在氨基酸水平上具有 93% 以上的相似性。系统发育树显示棉卷叶野螟与斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*（Fabricius）遗传距离较近，通过同源建模获得了该棉卷叶野螟基因编码蛋白的理论三维结构。将棉卷叶野螟泛素基因与 pET-32a(+)连接，构建原核表达载体 pET-32a-ub，经 IPTG 诱导，棉卷叶野螟泛素基因在大肠杆菌 BL21(DE3) 中高效表达。本研究成功克隆了棉卷叶野螟泛素基因的编码区，并经 Western blotting 分析证明实现了该基因的原核表达，为进一步研究其在该昆虫体内的作用机理奠定了基础。

**关键词**：棉卷叶野螟；泛素；基因克隆；基因序列分析；原核表达

**中图分类号**：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2008)09-0910-06

# Cloning, sequence analysis and prokaryotic expression of the ubiquitin gene of *Haritalodes derogata* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae)

ZHANG Yu-Hong[1], LIN Tong[1,2,*], ZHANG Qi[1], CHANG Run-Lei[1], WEN Xiu-Jun[1] (1. College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou, 510642, China; 2. Research Centre of Economic Forest of South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract**: Ubiquitin plays a very important role in regulating non-lysosomal ATP-dependent protein degradation. The coding sequence of *Haritalodes derogata* (Fabricius) ubiquitin gene was cloned and determined (GenBank accession no. EU580145). The opening reading frame (ORF) is 228 bp in length, encoding 76 amino acids with the molecular weight of 8.53 kD and theoretical isoelectric point of 5.83. Multiple sequence alignment indicated that *H. derogata* ubiquitin shared more than 93% identity with those of other ten insect species at the amino acid level, indicating high homology among them. Phylogenetic tree indicated that *H. derogate* has close relationship with *Spodoptera litura* (Fabricius). The theoretical three-dimensional structure of this gene was displayed by homology modeling. Using pET-32a(+) as a fused expression vector, a recombinant plasmid pET-32a-ub containing the coding sequence of *H. derogata* ubiquitin gene was constructed. Western blotting indicated that the *H. derogata* ubiquitin gene was expressed successfully in the BL21 (DE3) strain of *Escherichia coli* induced with IPTG. The results may serve as basis for further studying the function of ubiquitin gene in this insect.

**Key words**: *Haritalodes derogata*; ubiquitin; gene cloning; gene sequence analysis; prokaryotic expression

泛素(ubiquitin，Ub)是 Goldstein 等(1975)从牛胸腺中分离到的一种由 76 个氨基酸残基组成的小分子蛋白质，相对分子质量约为 8.6 kD，普遍存在于真核细胞中。泛素主要通过 ATP 依赖性的泛素-蛋白酶复合体通路(ubiquitin-proteasomes pathway，UPP)途径，经泛素活化酶(E1)、泛素结合酶(E2)和泛素连接酶(E3)的梯级反应，高效并高度选择性地对胞质或胞核内蛋白进行完全或部分降解，如一些短命

基金项目：广东省自然科学基金项目(8151064201000068)；华南农业大学经济林研究中心资助项目(4400-32990190)；华南农业大学校长基金项目(4400-208012)

作者简介：张宇宏，女，1983 年 10 月生，辽宁锦州人，硕士研究生，研究方向为昆虫分子生物学，E-mail：rinkozhang@126.com

* 通讯作者 Author for correspondence，Tel.：020-38604890；E-mail：lintong@scau.edu.cn

收稿日期 Received：2008-05-22；接受日期 Accepted：2008-08-12

蛋白当附有泛素的蛋白质极易被 26S 蛋白酶体水解成多肽、氨基酸和可以重复使用的泛素分子（Wilkinson，2000）。泛素依赖性蛋白质降解涉及细胞周期调控、信号转导、DNA 修复和蛋白质数量控制（Laney and Hochstuasser，1999）。除此之外，泛素还参与调节细胞周期和分化、细胞对外界应急的免疫反应、离子通道、分泌的调控及细胞器的形成等（Ciechanover，2005）。另外，泛素还可作为分子伴侣参与核糖体的生物发生、DNA 转录调控及其他多种生理功能（Conaway *et al*.，2002），在生物体生命活动中起重要作用。

自 20 世纪 80 年代初以来，泛素及泛素-蛋白酶体通路一直是生物学领域的研究热点之一。一些昆虫的泛素基因已被克隆，如草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*（Guarion，1990）、家蝇 *Musca domestica*（金丰良等，2008）、烟草天蛾 *Manduca sexta*（Bishoff and Schwartz，1990）、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*（牛国栋等，2004）、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（李朝飞等，2005）、野桑蚕 *Bombyx mandarina*（陈正凯等，2007）的泛素基因等。泛素基因在昆虫的中肠、脂肪体、马氏管、飞行肌等组织中具有高水平的表达（Bishoff and Schwartz，1990；Barrio *et al*.，1994），表明泛素在昆虫生命活动中具有重要作用，但具体作用机制还不清楚。

棉卷叶野螟 *Haritalodes derogata*（Fabricius）属鳞翅目（Lepidoptera）螟蛾科（Pyralidae），是绿篱植物木槿的一种重要害虫（吴志远等，1990）。目前尚无棉卷叶野螟泛素及其基因研究的报道。本文用 RT-PCR 方法从棉卷叶野螟幼虫克隆了泛素基因，运用生物信息学方法对该基因进行序列分析，并实现了该基因的原核表达，为进一步研究棉卷叶野螟中泛素的生理功能奠定基础。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

**1.1.1**　昆虫来源：棉卷叶野螟采自广东省中山市。

**1.1.2**　菌株与质粒：感受态细胞 DH5α 为 Tiangen 公司产品，克隆载体 pUCm-T 和 pET-32a（+）分别购自 Sangon 公司和 Novagen 公司。

**1.1.3**　主要试剂：核酸分子量标准、蛋白分子量标准、Taq DNA 聚合酶和 Universal 通用型 DNA 纯化回收试剂盒、Anti-His Antibody、羊抗鼠 IgG-HRP、HRP-DAB 底物显色试剂盒为 Tiangen 公司产品，EZ Spin Column Total RNA Isolation Kit、cDNA 第一链合成试剂盒购自 Sangon 公司。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2　方法

**1.2.1**　简并引物设计与合成：根据已知的鳞翅目昆虫等泛素蛋白氨基酸序列的高度保守性，并参考于航等（2004）和金小宝等（2007）等的引物序列，设计一对简并引物。正向引物：5′-ATGCA（AG）AT（CT）TT（CT）GTIAA-3′，氨基酸序列：MQIFVK；反向引物：5′-（AG）CCACCICG（CGA）AGIC（TG）（CGA）A（GA）（CG）AC-3′，氨基酸序列：VLRLRGG。引物由上海生工（Sangon）公司合成，使用前用 TE 缓冲液稀释至 10 μmol/L。

**1.2.2**　棉卷叶野螟总 RNA 的提取：取 1 头棉卷叶野螟，在液氮冷冻条件下将其充分研磨，转入 1.5 mL Eppendorf 管中，具体操作按 EZ Spin Column Total RNA Isolation Kit 说明书进行。提取的总 RNA 置于 −70℃保存备用。

**1.2.3**　第一链 cDNA 的合成：在新的 0.2 mL Eppendorf 管中，加入 1.5 μL 总 RNA（约 2 μg），操作按照 cDNA 第一链合成试剂盒说明书进行。得到的 cDNA 第一链 −20℃保存备用。

**1.2.4**　RT-PCR 扩增基因：利用简并引物扩增棉卷叶野螟泛素基因，反应体系：25 μL 反应体系中含 2.5 μL 10 × PCR buffer，10 pmol/each dNTP，10 pmol/each primer，1.5 units Taq-polymerase，约 2 ng cDNA。样品先 94℃预变性 5 min，按下述条件进行 PCR：94℃ 1 min，45℃ 1 min，72℃ 1 min，35 个循环后 72℃ 10 min，扩增完毕后 4℃终止反应。

**1.2.5**　PCR 产物的克隆与测序：PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后回收、纯化，具体步骤参照 DNA 纯化回收试剂盒说明书进行。纯化的 PCR 产物与 pUCm-T 载体连接，重组子 pUCm-T-Ub 转化 DH 5α 大肠杆菌；挑取单个白色菌落于 37℃过夜培养后抽提质粒，PCR 鉴定后交由上海 Sangon 公司测序。

**1.2.6**　序列分析：应用 DNAtools 软件将所得 DNA 序列翻译成蛋白质序列，从 GenBank 数据库中检索并下载昆虫泛素氨基酸序列，用 GENEDOC 软件比较棉卷叶野螟与其他昆虫泛素的相似性。应用 ClustalX 和 MEGA4 软件进行比对并建立泛素的系统发育树。

**1.2.7**　泛素的同源建模：通过 SWISS-MODEL（http://swissmodel.expasy.org）进行同源建模，用 SWISS-PDBViewer 软件观察蛋白三维结构，用原子间经验平均力势能（atomic empirical mean force potential，

Anolea)评价同源建模结果。

**1.2.8** 原核表达载体的构建：根据测序结果设计一对特异引物：含 *Bam*HⅠ位点的正向引物：5′-CGGGATCCATGCAGATTTTCGTG-3′，含 *Hin*dⅢ位点的反向引物：5′-CCCAAGCTTACCACCGCGGAGGCT-3′，以重组质粒 pUCm-T-Ub 为模板进行 PCR 扩增，扩增产物经 *Bam*HⅠ和 *Hin*dⅢ双酶切后，与经同样双酶切的表达载体 pET-32a(+)连接，构建重组表达质粒 pET-32a-ub。

**1.2.9** 泛素融合蛋白的原核表达及 Western blotting 检测：转化 pET-32a-ub 到大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中。在 LB/Amp 培养基，37℃培养至 $OD_{600}$ = 0.5 左右时，加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L 诱导目的蛋白表达。在 37℃下诱导 4 h 后取样，用 15% SDS-PAGE 电泳检测。将 SDS-PAGE 电泳的目的蛋白条带转移到硝酸纤维素膜上，封闭液封闭后，以 Anti-His Antibody 为一抗，羊抗鼠 IgG-HRP 为二抗与之反应，最后用 HRP-DAB 底物显色试剂盒显色。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR 扩增

根据真核生物泛素蛋白 N-端和 C-端高度保守的氨基酸序列 MQIFVK 和 VLRLRGG，设计一对简并引物，通过 RT-PCR 方法扩增棉卷叶野螟泛素基因编码区。RT-PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测，获得了约为 230 bp 的片段(图 1)。回收该片段，与克隆载体 pUCm-T 连接；挑选阳性克隆，提取质粒 DNA，PCR 鉴定，经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测发现所得片段长度与预测一致(图略)。将 PCR 鉴定正确的重组质粒送交上海 Sangon 公司测序。

### 2.2 棉卷叶野螟泛素基因的编码区

基因测序结果表明，所得棉卷叶野螟泛素基因编码区长度为 228 bp，编码 76 个氨基酸(图 2)，推测编码蛋白的分子量为 8.53 kD，等电点为 5.83，GenBank 登录号为 EU580145。

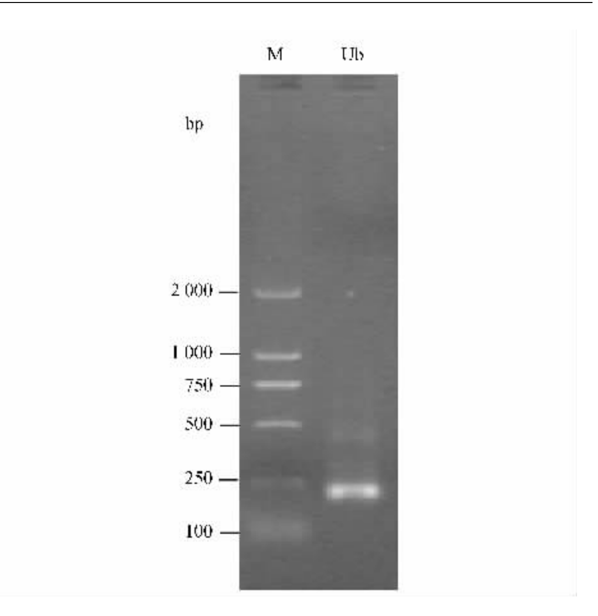



图 1 棉卷叶野螟泛素基因编码区 RT-PCR 结果
Fig. 1 RT-PCR result of the coding sequence of *Haritalodes derogata* ubiquitin gene
M: DL2000 marker; Ub: 棉卷叶野螟泛素基因 *H. derogata* ubiquitin gene.

### 2.3 棉卷叶野螟等昆虫泛素同源性分析及系统发育树

用 GENEDOC 软件对棉卷叶野螟泛素与其他昆虫泛素的氨基酸序列同源性比对的结果(图 3)表明，棉卷叶野螟泛素与其他昆虫泛素的氨基酸序列有很高的同源性，仅有 1~5 个氨基酸不同；与甜菜夜蛾、野桑蚕同源性为 93%，与美洲大蠊 *Periplaneta americana*、家蚕 *B. mori* 同源性为 96%，与草地贪夜蛾、黑腹果蝇 *Drosphila melanogaster*、斜纹夜蛾 *S. litura*、德国小蠊 *Blattella germanica*、棉铃虫、烟草天蛾同源性为 97%。

11 种昆虫泛素基因基于氨基酸序列的 NJ (neighbor-joining)无根系统发育树(500 次抽样)见图 4。其中，棉卷叶野螟与草地贪夜蛾、烟草天蛾、黑腹果蝇、棉铃虫、斜纹夜蛾遗传距离较近、关系密切，与美洲大蠊、德国小蠊、家蚕、甜菜夜蛾在同一分支下，与野桑蚕遗传距离较远。

```
  1 ATG CAG ATT TTC GTG AAG ACC CTG ACT GGT AAG ACA ATT ACA TTG GAG GTT GAG CCA TCT   60
  1 M   Q   I   F   V   K   T   L   T   G   K   T   I   T   L   E   V   E   P   S     20
 61 GAC ACA ATT GAG AAT GTA AAG GCC AAA ATC CAG GAC AAA GAA GGC ATT CCT CCA GAC CAG  120
 21 D   T   I   E   N   V   K   A   K   I   Q   D   K   E   G   I   P   P   D   Q     40
121 CAG CGT TTG ATT TTC GCT GGT AAA CAG CTA GAA GAT GGG CGC ACA TTA TCA GAT TAC AAT  180
 41 Q   R   L   I   F   A   G   K   Q   L   E   D   G   R   T   L   S   D   Y   N     60
181 ATC CAG AAG GAA TCA ACT CTT CAC TTG GTG CTT CGC CTT CGC GGT GGT                  228
 61 I   Q   K   E   S   T   L   H   L   V   L   R   L   R   G   G                     80
```

图 2 棉卷叶野螟泛素基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列
Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Haritalodes derogata* ubiquitin gene

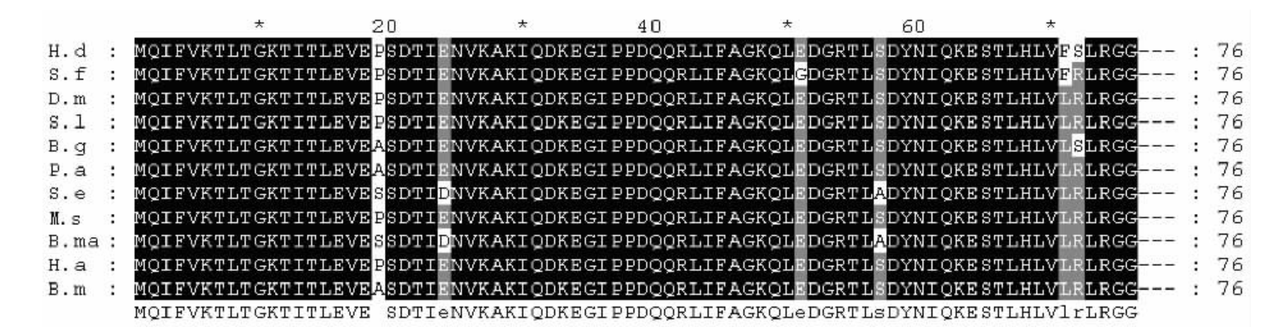



图 3　棉卷叶野螟与其他昆虫泛素氨基酸序列比较

Fig. 3　Alignment of the amino acid sequences of ubiquitin proteins of 11 insect species

H.d：棉卷叶野螟 *Haritalodes derogata*；S.f：草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*（GenBank accession no. M30306）；D.m：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（GenBank accession no. X59943）；S.l：斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*（GenBank accession no. AF436066）；B.g：德国小蠊 *Blattella germanica*（GenBank accession no. AY501003）；P.a：美洲大蠊 *Periplaneta americana*（GenBank accession No. EF101563）；S.e：甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*（GenBank accession no. AY149883）；M.s：烟草天蛾 *Manduca sexta*（GenBank accession no. X53524）；B.ma：野桑蚕 *Bombyx mandarina*（GenBank accession no. DQ839401）；H.a：棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（GenBank accession no. AY456195）；B.m：家蚕 *Bombyx mori*（GenBank accession no. AF308163）. 图 4 同 The same for Fig. 4.

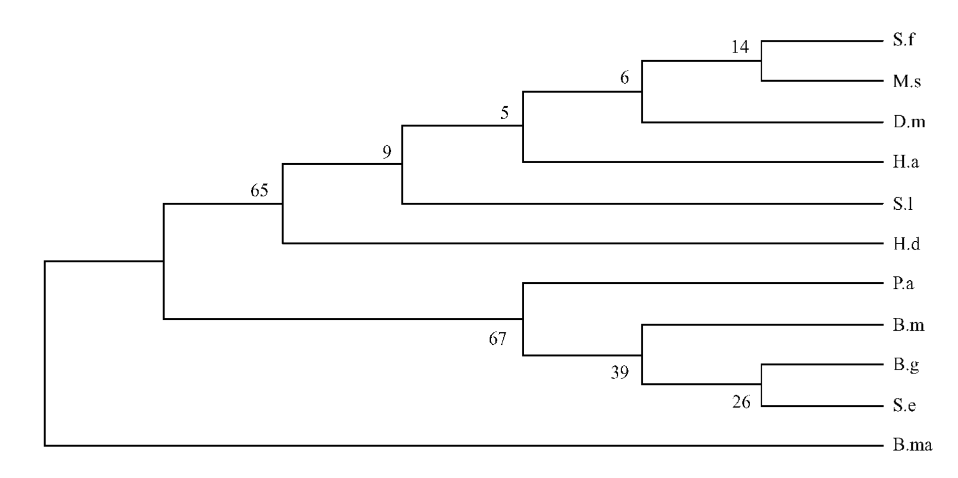



图 4　棉卷叶野螟与其他昆虫基于泛素氨基酸序列的系统发育树

Fig. 4　Phylogenetic tree of amino acid sequences of ubiquitin genes of *Haritalodes derogata* and other insects

## 2.4　棉卷叶野螟泛素同源建模

利用 SWISS-MODEL 服务器进行同源建模，以人的泛素基因为模板，获得棉卷叶野螟泛素的理论三维结构(图 5)。结果表明，棉卷叶野螟泛素含有一个三圈半的 α 螺旋(残基 23－34，其中有 3 个是疏水螺旋，蓝绿色)、1 个 310-螺旋(残基 56－59，黄色)、5 个 β 折叠(残基 1－7，10－17，40－45，48－50，64－72，深蓝色、蓝色、绿色、黄绿色、红棕色)和 7 个反向转角。Anolea 评价同源建模结果显示：绿色的区域为与模板拟合的空间结构，红色的区域为拟合程度不高的空间结构，可见，只有两个氨基酸残基的空间结构拟合程度不高(图 6)。

## 2.5　泛素的原核表达及 Western blotting 检测

将所克隆的泛素基因重组入 pET-32a(＋)，构建原核表达质粒 pET-32a-ub，经 PCR 鉴定正确后，将重组质粒转化入 BL21(DE3)菌株。经 IPTG 诱导培养，



图 5　棉卷叶野螟泛素蛋白理论三维结构

Fig. 5　The theoretical three-dimensional structure of *Haritalodes derogata* ubiquitin protein

15% SDS-PAGE 电泳结果表明，表达的融合蛋白在 28.5 kD 左右有明显的特异条带产生，而未插入泛素基因的 pET-32a(＋)表达的蛋白在约 20 kD 处有特异性条带出现(图 7)，与预测的分子量大小吻合；此外，免疫印迹试验证实重组蛋白可以被组氨酸特异

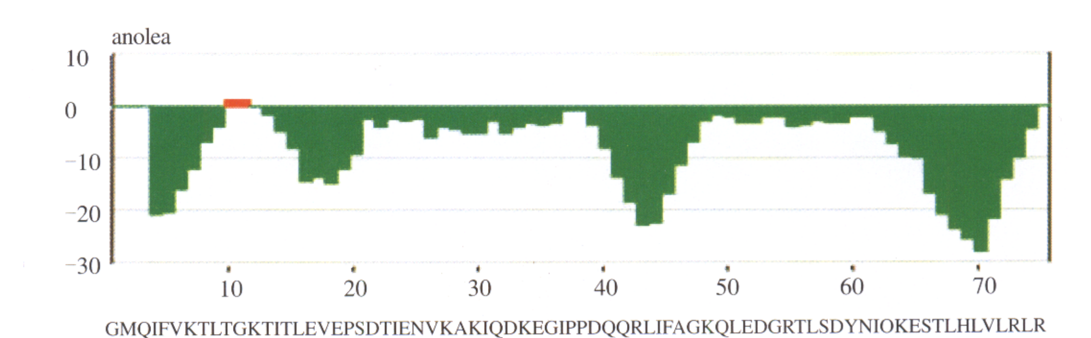



图 6 原子间经验平均力势能评价分析

Fig. 6 Analysis of the atomic empirical mean force potential

单抗所识别，表明泛素蛋白以带有组氨酸标签的融合蛋白形式表达（图 7）。

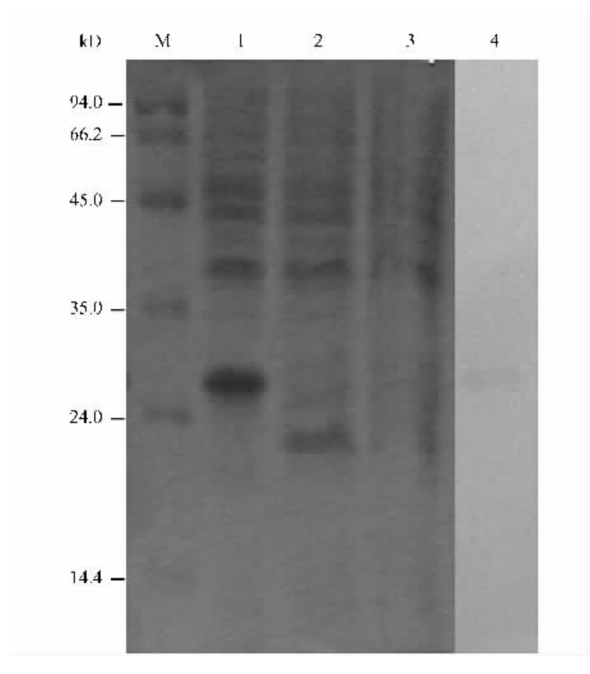



图 7 棉卷叶野螟泛素融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳及 Western blotting 分析

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of *Haritalodes derogata* ubiquitin expressed in *Escherichia coli* and Western blotting

M：蛋白分子量标准 Protein molecular standard maker；1：在 IPTG 诱导下 pET-32a-ub 的表达 Expression of pET-32a-ub after induction with IPTG；2：在 IPTG 诱导下 pET-32a（+）的表达 Expression of pET-32a（+）after induction with IPTG；3：没有 IPTG 诱导条件下 pET-32a-ub 的表达 Expression of pET-32a-ub without IPTG；4：免疫印迹 Western blotting.

## 3 讨论

从不同种属的真核生物中得到的泛素一级结构相似性很高（Patnaik *et al*.，2000；Glickman and Ciechanover，2002）。本研究克隆的棉卷叶野螟泛素基因与已知的其他昆虫泛素的氨基酸序列仅有 1～5 个氨基酸的不同，在氨基酸水平上具有 93% 以上的相似性。通过系统发育树，显示了昆虫泛素基因之间的进化关系，虽然昆虫泛素蛋白氨基酸序列的一致性很高，但其亲缘关系的远近仍有差别。通过对棉卷叶野螟泛素蛋白结构的同源建模，发现其蛋白结构非常保守，与人的泛素蛋白三维结构几乎完全相同。

本实验选用的 pET-32a（+）是由 T7 启动子启动的高效融合表达载体，其 N 端含有 109 个氨基酸的硫氧还蛋白和 6 个组氨酸标签，表达的蛋白相对分子质量约为 20 kD。由于棉卷叶野螟泛素蛋白预测分子量为 8.53 kD，所以表达的融合蛋白应为 28 kD 左右，与实际表达的蛋白大小一致，故棉卷叶野螟泛素基因得到了表达。此外，用组氨酸抗体做一抗，通过 Western blot 免疫杂交，验证了连接到 pET-32a（+）表达载体上的棉卷叶野螟泛素基因的表达。

目前，已知泛素和许多生命过程有关，但具体的机制还不很清楚。棉卷叶野螟泛素基因的成功克隆与原核表达，包括其三维结构的预测，可为进一步研究泛素在棉卷叶野螟机体内的作用、泛素系统如何对蛋白进行选择性调控及其在疾病的病理过程中发病机制，以及弄清作用于底物蛋白的特异性泛素连接酶及识别底物蛋白的信号等打下基础。下一步工作将通过免疫家兔制备棉卷叶野螟泛素的抗血清，深入研究泛素基因在棉卷叶野螟体内不同组织或器官，以及在不同发育阶段的表达情况。

## 参考文献（References）

Barrio R，del Arco A，Cabrera HL，Arribas C，1994. Structure and expression of the *Drosophila* ubiquitin-80-amino acid fusion protein-gene. *Biochem. J.*，302：237－244.

Bishoff ST，Schwartz LM，1990. Characterization of a ubiquitin-fusion gene from the tobacco hawkmoth，*Manduca sexta*. *Nucleic Acids Res.*，18（20）：6 039－6 043.

Ciechanover A，2005. Intracellular protein degradation：from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human

diseases and drug targeting. *Cell Death and Differentiation*，12：1 178 – 1 190.

Chen ZK，Zhou J，Bao LJ，Xu J，Shen WD，Lu XP，2007. Cloning and expression of ubiquitin gene of *Bombyx mandarina*. *Science of Sericulture*，33(2)：297 – 231.[陈正凯，周君，包立军，徐剑，沈卫德，陆小平，2007. 野桑蚕泛素基因的克隆及原核表达. 蚕业科学，33(2)：297 – 231]

Conaway RC，Brower CS，Conaway JW，2002. Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science*，296：1 254 – 1 258.

Glickman MH，Ciechanover A，2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.*，82 (2)：373 – 428.

Goldstein G，Scheid M，Hammerling U，Boyse EA，Schlesinger DH，Niall HD，1975. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，72(1)：11 – 15.

Guarino LA，1990. Identification of a viral gene encoding a ubiquitin-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，87(1)：409 – 413.

Jin FL，Xu XX，Zhang WQ，Ren SX，2008. Cloning and prokaryotic expression of the cDNA sequence encoding ubiquitin from *Musca domestica*. *Acta Entomologica Sinica*，51(5)：473 – 479.[金丰良，许小霞，张文庆，任顺祥，2008. 家蝇泛素编码区 cDNA 序列的克隆及在原核细胞中的表达.昆虫学报，51(5)：473 – 479]

Jin XB，Liu LS，Zhu JY，Ma Y，Wang Y，2007. Cloning and bioinformatics analysis of an ubquitin gene of *Periplaneta americana*. *Journal of Pathogen Biology*，2(5)：371 – 373.[金小宝，刘雷山，朱家勇，马艳，王艳，2007. 美洲大蠊泛素基因的克隆及生物信息学分析.中国病原生物学杂志，2(5)：371 – 373]

Laney JD，Hochstuasser M，1999. Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell*，97：427 – 430.

Li ZF，Yu h，Pan LJ，Pang Y，2005. Cloning and sequence analysis of *Helicoverpa armigera* ubiquitin gene. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*，44(1)：61 – 64.[李朝飞，于航，潘丽晶，杨凯，庞义，2005. 棉铃虫泛素基因的克隆及序列分析. 中山大学学报(自然科学版)，44(1)：61 – 64]

Niu GD，Zhang HY，Zhang ZX，2004. Amplication with 3′ RACE-PCR，cloning and prokaryotic expression of ubiquitin extension protein cDNA of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*，47(2)：166 – 170.[牛国栋，张海元，张忠信，2004. 甜菜夜蛾泛素延伸蛋白基因 cDNA 的 3′ RACE-PCR 扩增及其克隆和表达. 昆虫学报，47(2)：166 – 170]

Patnaik A，Chau V，Wills JW，2000. Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，97：13 069 – 13 074.

Wilkinson KD，2000. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin. Cell Dev. Biol.*，11：141 – 148.

Wu ZY，Tu YH，Huang DL，Xiao CH，1990. Studies on bionomics and control of *Haritalodes derogata*. *Journal of Fujian College of Forestry*，10(4)：350 – 357.[吴志远，涂育合，黄德龙，肖长汉，1990. 棉卷叶野螟的生物学与防治. 福建林学院学报，10(4)：350 – 357]

Yu H，Jin FL，Xu XX，Yang X，Gu DX，Zhang WQ，2004. Cloning and sequence analysis of an ubiquitin gene of *Blattella germanica*. *Acta Entomologica Sinica*，47(4)：522 – 525.[于航，金丰良，许小霞，杨杏，古德祥，张文庆，2004. 德国小蠊泛素基因的克隆及序列分析. 昆虫学报，47(4)：522 – 525]

(责任编辑：赵利辉)